第22卷 第2期　　昆 虫 学 报　　Vol. 22, No. 2
1979 年 5 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　May, 1979

连续通过粘虫虫体传代对苏云金杆菌晶体形成的影响

幸兴球　谢强江　杨明华
（中国科学院动物研究所）

史泰奥斯（1956）曾指出，昆虫病原微生物连续通过敏感寄生可以提高病原的毒性，吉川等(1974)将苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* Berl.)的一个菌株通过斜纹夜蛾（*Spodoptera litura*）作传代试验(不是连续传代,中间经过平板分离),发现经过6次传代后细菌在虫尸内增殖良好。在我国，一般也认为通过虫体传代可以恢复或提高毒力,即所谓"虫体复壮"(盛祖嘉,1974)。我们试图用这个方法来得到对粘虫(*Leucania separata* Wal.)毒力强的菌株。但发现所有试验的6个菌株，在经过10到14次传代之后都相继失去了产生晶体的能力。在将要失去产生晶体能力之前的几代，一些菌株晶体大小发生变化，从中分离到一个对粘虫毒力较强的菌株——IIA9(九)株。

本文报告这一传代试验及其结果。

材料和方法

（一）供传代的苏云金杆菌（*Bacillus thuringiensis*, 下略为 *B. t.*）菌株

科010株——本所昆虫病理组保存（昆虫病理组,1973）。

C_1 株——从美国商品 Dipel 粉剂中分离的培养物。

E013 株——从英国引进的菌株(var. *tolworthi*)，本所昆虫病理组保存。

IIA9 株、IIA29 株和 IIW1 株——为 E013 株经紫外线处理后获得的变异株。使用的紫外灯波长 2537 Å，距离 35 厘米，照射4分钟。细菌为肉汤振动培养10小时并经水洗的营养体。

（二）培养基

1. 普通肉汤琼脂培养基——蛋白胨1.0%，牛肉膏0.5%，琼脂2.0%（供菌种保存和平板分离用）。
2. 三角瓶液体培养基——豆饼粉2.4%，玉米粉1.0%，玉米浆2.0%，$CaCO_3$ 0.1%（供毒力试验用）。

（三）虫体传代

传代的菌株斜面菌苔小半环在1毫升0.1%洗衣粉水中制成悬液，将小麦叶片或玉米叶片3—4片浸入，取出放入有滤纸的培养皿中凉干，每皿放入4—6条5—6龄粘虫幼虫，30℃保温饲养一天后，将幼虫用0.1%升汞水体表灭菌，再投入热开水中杀死，取出放入有滤纸的灭菌培养皿中。为了防止虫尸干燥，皿中加一小块无菌水湿棉球，继续保温2—3天后，取虫尸中段体液镜检，芽孢、晶体形成者用镊子取出并用70%酒精进行体表灭菌，将虫尸放入装有约1毫升0.1%无菌洗衣粉水的试管中捣碎，以此作为菌悬液再反复进行传代。

（四）毒力试验

1. 细菌培养　将液体培养基分装入500毫升三角瓶内，每瓶30毫升，1.1公斤/厘米² 灭菌30分钟。接种后，30℃摇床振动培养直到芽孢晶体形成。

2. 毒力测定方法　将摇床培养的菌液（约每毫升35—40亿芽孢）用0.1%洗衣粉水稀释20倍（每毫升约为1.5—2.0亿芽孢）。将可供3天食用的玉米叶剪成8—9厘米一段，浸入菌悬液中，取出凉干，每罐头瓶内放入玉米叶5—6片及20条4龄第一天的幼虫，两个重复，29℃±1保温饲养（剩余玉米叶片放入培养皿内，置4℃冰箱中待换用）。处理后连续饲喂三天，记录存活和死亡虫数，计算死亡率。对照用0.1%洗衣粉水浸过的玉米叶。重复两次。

结　果

（一）在虫尸中芽孢、晶体形成情况

所有试验菌株在第一次传代的粘虫虫尸内都能形成芽孢和晶体，体液呈乳白色。从杀死幼虫后培养算起，芽孢、晶体形成的时间一般为72小时，一些菌株较快，如E013株，IIA29株，IIW1株48小时就大量形成芽孢、晶体。IIA9株最慢，

到 96 小时才大量形成。在虫尸中传代 5—6 次基本上保持原菌株在普通肉汤琼脂上的生长特点。如，IIA9 株芽孢形成慢，晶体细碎；IIW1 株，IIA29 株和 E013 株芽孢、晶体形成较快并整齐，科 010 株晶体比其他菌株大。但在第 10 次传代时发现 IIA29 株在虫尸内只形成芽孢不产生晶体。其后，其他菌株也在第 11—14 代相继不产生晶体(见表1)，即使转入普通肉汤琼脂上培养也没有看到再产生晶体。

在不产生晶体之前的几代已发现一些菌株的晶体大小发生变化，如 C_1 株在 6—7 代时，晶体变大而且整齐(但在 8—9 代之后晶体又变小了)。又如 IIA9 株在第 9 代时晶体由细碎变得大而整齐，科 010 在 8—9 代时晶体变小，随后变为不产生晶体。E013 在 11 代时晶体较大，但用这一代的菌继续传代或进行平板分离均看不到晶体再产生。

IIW1 在 13 代不产生晶体之后，继续再传到16代仍只产生芽孢不产生晶体。

表 1　苏云金杆菌的一些菌株连续通过粘虫虫体传代后晶体产生情况*

菌　株	…第 9 代	第 10 代	第 11 代	第 12 代	第 13 代	第 14 代	第 15 代	第 16 代
科 010	……S^+C^+	S^+C^+	S^+C^-					
C_1	……S^+C^+	S^+C^+	S^+C^+	S^+C^+	S^+C^+	S^+C^-		
E013	……S^+C^+	S^+C^+	S^+C^+	S^+C^-				
IIA9	……S^+C^+	S^+C^+	S^+C^+	S^+C^+	S^+C^+	S^+C^-		
IIA29	……S^+C^+	S^+C^-						
IIW1	……S^+C^+	S^+C^+	S^+C^+	S^+C^+	S^+C^-	S^+C^-	S^+C^-	S^+C^-

* S^+C^+ 为产生芽孢、晶体；S^+C^- 为只产生芽孢不产生晶体。

(二) 对粘虫毒力测定结果

前已述及，进行粘虫虫体传代的目的是想得到对粘虫毒力强的菌株。因此，挑取晶体发生了变化的虫尸，将其中的菌液进行平板分离培养，4℃保存。对这些菌株连同原株一起进行了毒力测定。发现其中的二个菌株——IIA9(九) 株(从 IIA9 第 9 次传代的虫尸中分离的菌株)和 C_1 株(从美国 Dipel 粉剂分离的培养物)毒力较高。每毫升 1.5—2.0 亿芽孢浓度处理三天后对 4 龄第一天幼虫的死亡率分别为 97.5%和 100%。其他菌株毒力不理想或全无毒力。表 2 列出经过传代和未经传代的一些菌株的测定结果。IIA9(九) 的

表 2　经虫体传代和未经虫体传代的一些菌株对粘虫的毒力测定结果*

试验菌株	试验次数	试验虫数	死亡虫数			总死亡虫数	死亡率(%)
			24小时	48小时	72小时		
E013	一	40	6	9	4	19	47.5
	二	40	0	3	7	10	25
IIA9	一	40	0	0	0	0	0
	二	40	0	0	0	0	0
IIA9(九)	一	40	12	21	6	39	97.5
	二	40	9	23	7	39	97.5
IIW1(十六)	一	40	0	0	0	0	0
	二	40	0	0	0	0	0
C_1	一	40	15	22	3	40	100
	二	40	14	24	2	40	100
对　照	一	40	0	0	0	0	0
	二	40	0	0	0	0	0

* E013 和 IIA9 为未经传代菌株；
IIA9(九)为从 IIA9 第 9 次传代的虫尸中分离的菌株；
IIW1(十六) 为从 IIW1 第16次传代的虫尸中分离的菌株；
C_1 为从美国 Dipel 粉剂分离的培养物，未经传代。

原株为 IIA9，IIA9 是从 E013 得来的。从表 2 可以看到 IIA9 全无毒力，E013 毒力也不高(一次为 47.5%，另一次为 25%)。

随后我们用 $IIA9_{(九)}$，C_1 和 E013 这三个菌株反复进行了多次室内测定。$IIA9_{(九)}$，C_1 都保持一致的效果，E013 较有波动，但毒效均不高。1977 年 8 月，在北京市平谷县用这三个菌株进行了一次野外试验，试验结果见表 3。$IIA9_{(九)}$ 和 C_1 对粘虫仍有相当效果，但不如实验室内效果好。

显微镜检査 $IIA9_{(九)}$ 和 C_1 这两个毒力较高的菌株，可以看到前者晶体大而整齐，后者则不甚整齐，大晶体比例不高。

表 3 $IIA9_{(九)}$，E013 和 C_1 三个菌株的野外试验结果*

菌株	喷菌前每平方米虫数	喷菌后总虫数			虫口下降率(%)
		24小时	48小时	72小时	
$IIA9_{(九)}$	49	30	23	17	65.3
E013	67	80	72	58	13.4
C_1	70	59	23	25	63.7
对照	49	47	32	42	14.2

* $IIA9_{(九)}$，E013 和 C_1 均由武汉微生物农药厂生产。
试验地为北京市平谷县南独乐河大队谷子地，以 4 分地为一区，每区喷 2 亿芽孢/毫升菌悬液 (0.1% 洗衣粉) 20 斤。

讨 论

Smirnoff 等 (1961) 曾指出腊状芽孢杆菌群 (*Bacillus cereus* group) 的细菌一般在昆虫虫尸内不易形成芽孢。鲇沢等 (1962) 用美国商品制剂 Agritol 的分离培养物对在蚕尸内的芽孢形成进行的研究也得到同样的结果。但随后鲇沢等(1964)又报告用 *B. t.* T84A 株试验时得到不同的结果，即 T84A 株在蚕尸内比较容易形成芽孢和晶体。并且认为试验结果不同可能是由于菌株不同的缘故。

我们用 *B. t.* 的 6 个菌株连续通过粘虫虫体进行传代试验，在第 9 代之前的虫尸内都可以看到芽孢晶体形成，但是第 10—14 代时，所有菌株在虫尸内均相继不形成晶体只形成芽孢。这个结果同 Toumanoff 等在培养基上连续传代的结果很相似。Toumanoff 等将 *B. t.* 在碱性培养基 (pH9—9.5)上连续传代之后，发现晶体产生能力消失(见刘崇乐等,1962)，而粘虫消化道液体的pH 也为碱性 (pH8.5—9)。

现已知道，*B. t.* 的杀虫效果主要是由于细菌产生的各种毒素——特别是晶体毒素作用的结果。但是，正如鲇沢等(1976)所指出：晶体毒素不一定是稳定的，如果一旦消失之后便不会再恢复形成，而且变得对昆虫无毒。我们的试验结果也说明了这一点。IIW1 在传到第13代时，晶体消失了，即使继续传代也没有看到晶体再形成。用经过 16 次传代后分离的不形成晶体的细菌进行试虫，完全没有毒力。

晶体的大小与毒力的关系，是一个引起重视的问题。$IIA9_{(九)}$ 株和 C_1 株对粘虫的毒力差不多。但两者的晶体大小并不相同。前者的晶体比起所有传代的菌株都大，后者则大小不齐，小晶体的比例还很高。所以，关于这两个菌株的致病机制需要进一步探讨。

B. t. 在虫尸中只形成芽孢不形成晶体的现象，Prasertphon 等(1973)也曾观察到。因此用这个方法进行"虫体复壮"时需要注意。我们认为通过虫体传代注意观察、及时分离是可能筛选出毒力较高的菌株的。

参 考 文 献

史泰奥斯，E. A.（忻介六等译）1956 昆虫病理学原理(上册)第 235 页 科学出版社。

吉川直宏ら 1974 日本应用动物昆虫学会大会讲演要旨 第18回 第 413 页。

盛祖嘉 1974 微生物学通报 **4**: 34—8。

Smirnoff, W. A. et al. 1961 J. Inverteb. Pathol. **3**: 403—8。

鮎沢啓夫ら 1962 日本蚕丝学杂志 **31**: 253—7。

鮎沢啓夫ら 1964 日本蚕丝学杂志 **33**: 399—401。

刘崇乐等 1962 苏云金杆菌研究的五十年 第 10 页 科学出版社。

昆虫病理组 1973 昆虫学报 **16**: 91—3。

鮎沢啓夫ら 1976 化学と生物 **14**: 214—21。

Prasertphon, S. et al. 1973 J. Invert. Pathol. **21**: 205—7.

EFFECT OF SUCCESSIVE CULTIVATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IN ARMYWORM UPON CRYSTAL FORMATION

SHING SHING-ZHU　XIE QIANG-JIANG　YANG MING-HUA

(Institute of Zoology Academia Sinica, Peking)